

Fenotipske i biohemijske karakteristike genotipova kukuruza u procesu selekcije na visok kvalitet proteina u zrnju

- Originalni naučni rad -

Dragana IGNJATOVIĆ-MIČIĆ, Marija KOSTADINOVIĆ, Ksenija MARKOVIĆ,
Sladana ŽILIĆ, Snažana MLADENOVIĆ DRINIĆ i Goran STANKOVIĆ
Institut za kukuruz "Zemun Polje", Beograd-Zemun

Izvod: Hranjiva vrednost kukuruza je dosta niska zbog nedostatka dve esencijalne aminokiseline - lizina i triptofana. Šezdesetih godina prošlog veka otkriven je prirodni *opaque2* mutant kukuruza, koji u endospermu zrna sadrži 69-100% više lizina i 66% više triptofana u odnosu na standardan kukuruz. Inkorporacija *opaque2* gena u visoko prinodne komercijalne hibride se pokazala neuspešnom zbog brojnih agronomskih nedostataka i problema u preradi, uzrokovanih mekim endospermom. Ovi nedostaci mogu biti prevaziđeni stvaranjem kukuruza visokog kvaliteta proteina (*quality protein maize* - QPM), koji pored *opaque2* gena sadrži i gene modifikatore tvrdoće zrna. U Institutu za kukuruz "Zemun Polje" kroz program stvaranja QPM germplazme formirane su F5 i BC1F3 generacije ukrštanja QPM x *opaque*, *opaque2* x QPM i standardne linije x QPM. Utvrđene su fenotipske karakteristike, prinos po biljci, modifikacije endosperma i biohemijske karakteristike zrna (sadržaj proteina, sadržaj triptofana i indeks kvaliteta) F5 i BC1F3 biljaka, radi odabira genotipova za dalji proces selekcije. Potomstva ukrštanja *opaque2* x QPM su imale najviši prinos po biljci - 314,3 g u BC1F3 i 230,2 g u F5. Sadržaj triptofana i indeks kvaliteta u celom zrnju F5 i BC1F3 generacijama ukrštanja između QPM i *opaque2* linija je bio na nivou sadržaja triptofana QPM germplazme u 72% genotipova, kao i u sedam od devet ukrštanja između standardnih i QPM linija. Svi genotipovi koji su imali lošu modifikaciju zrna, nizak sadržaj triptofana i/ili nizak prinos po biljci će biti odbačeni u daljem procesu selekcije.

Ključne reči: Kukuruz, prinos, QPM, triptofan, tvrdoća endosperma

Uvod

Biljni proteini zauzimaju značajno mesto u ishrani ljudi i domaćih životinja, a od ukupno proizvedenih biljnih proteina dve trećine pripadaju žitima. Kukuruz

spada među tri najznačajnije žita u svetu, a u Srbiji se po proizvodnji nalazi na prvom mestu. Međutim, hranjiva vrednost kukuruza je dosta niska zbog nedostatka dve esencijalne aminokiseline - lizina i triptofana. Značajna istraživanja na poboljšanju kvaliteta proteina su započeta 60ih godina prošlog veka, nakon otkrića da je u endospermu zrna prirodnog *opaque2* mutanta kukuruza sadržaj lizina povećan za 69-100% i triptofana za 66% u odnosu na standardan kukuruz, **Mertz i sar.**, 1964, **Eggum i sar.**, 1983, 1985. Kukuruz, homozigotan za *o2* recesivnu mutaciju, ima značajno veći sadržaj lizina i triptofana u odnosu na homozigotno dominantan (*O2O2*) ili heterozigotno (*O2o2*) *opaque2* lokus, **Crow i Kermicle**, 2002. **Bressani**, 1992, je pokazao da povećane koncentracije ove dve aminokiseline u endospermu zrna mogu udvostručiti biološku vrednost proteina kukuruza. Biološka vrednost kukuruza sa visokim sadržajem triptofana je 80%, mleka 90%, a standardnog kukuruza 40%, **FAO**, 1992.

Inkorporacija *opaque2* gena u visoko prinosne komercijalne hibride se pokazala neuspešnom zbog brojnih agronomskih nedostataka i problema u preradi - sniženog prinosa, mekog endosperma, brašnjavog i nepopunjenog zrna, kao i osetljivosti na trulež klipa i štetočine skladištenog zrna. Ovi nedostaci se mogu prevazići stvaranjem kukuruza visokog kvaliteta proteina, **Vivek i sar.**, 2008.

Stvaranje kukuruza visokog kvaliteta proteina (*quality protein maize* - QPM) obuhvata manipulacije sa tri posebna genetička sistema: 1) *opaque-2* recesivne alele (*o2o2*), 2) gene modifikatore/poboljšivače *o2o2* gena koji pojačavaju sadržaj lizina i triptofana u endospermu i 3) gene modifikatore koji transformišu mekani endosperm u tvrd endosperm, **Krivanek i sar.**, 2007.

Proces stvaranja QPM germplazme obuhvata identifikaciju segreganata u populaciji koji su istovremeno homozigotno recesivni (*o2o2*) i imaju tvrd endosperm. Prisustvo ovih gena se lako može utvrditi projektovanjem svetla vidljivog dela spektra kroz zmo, korišćenjem prosvetljivača (*light box*). Zrna koja su neprozirna ukazuju na prisustvo *opaque2* gena, a stepen neprozirnosti se određuju vizuelno, na osnovu stepena transparentnosti, skalom od 1 do 5. Da bi se sa što većom sigurnošću za svaku fazu selekcije odabralo odgovarajuće zmo (sa *o2o2* mutacijom i genima modifikatorima tvrdoće endosperma) preporučuje se odabir zrna tipa 3 u F₂, tipa 2 i 3 u F₃ i F₄ generacijama, a u ostalim generacijama samo zmo tipa 2, **Vivek i sar.**, 2008.

Pored odabira odgovarajućeg tipa modifikovanog zrna, neophodno je utvrditi sadržaj proteina, triptofana i indeks kvaliteta (odnos triptofana i proteina). QPM kukuruz je kukuruz koji u endospermu sadrži više od 0,07 triptofana i čiji je indeks kvalitet veći od 0,7, odnosno u celom znu više od 0,075 triptofana i indeks kvaliteta veći od 0,8, **Vivek i sar.**, 2008.

U Institutu za kukuruz "Zemun Polje" program stvaranja QPM germplazme ima sledeće ciljeve: 1) stvaranje QPM hibrida ukrštanjem domaćih i introdukovanih QPM linija, 2) popravku tvrdoće endosperma zrna postojećih *opaque2* linija i 3) prevođenje elitnih ZP linija standardnog kukuruza u QPM linije. Do sada su formirane F₅ i BC₁F₃ generacije ukrštanja QPM x *opaque2*, *opaque2* x QPM i standardne linije x QPM). U ovom radu su predstavljeni rezultati fenotipske analize biljaka navedenih generacija, kao i rezultati biohemijskih analiza i stepen modifikacije zrna.

Materijal i metode

Četiri QPM linije (CML144, CML159, CML161 i CML165 iz CYMMITa, Meksiko), dve QPM populacije (SussF and Mat-pro iz IIMa, Mozambik) i 15 *opaque2* linija (iz Instituta za kukuruz, Srbija) je korišćeno za dobijanje QPM x *opaque2* genotipova (16 BC1F3 i 48 F5) i *opaque2* x QPM genotipova (18 BC1F3 i 34 F5). Devet genotipova F5 ukrštanja standardne linije x QPM su dobijene od standardnih inbred linija (B73, 255/75-3 and 255/75-5) i genotipva kukuruza visokog kvaliteta proteina (CML144, CML159, CML161, CML165, SussF i Mat-pro).

U toku 2010. godine izvedeni su poljski ogledi u kojima je izvršena fenotipska ocena biljaka i izračunat prinos po biljci. Od svakog ukrštanja sejano je seme sa po dva klipa, u dva reda, a fenotipska ocena je data kao srednja vrednost deset biljaka. Analizirana su sledeća svojstva: visina biljke (VB), visina klipa (VK), broj klipova (BK), ukupan broj listova (UBL), broj listova do klipa (BLK), dužina klipa (DK), broj redova zrna (BRZ), broj zrna u redu (BZR), masa 1000 zrna (MHZ) i prinos po biljci (PB).

Modifikacije zrna su ocenjene vizualno korišćenjem prosvetljivača, prema skali od 1 (potpuno prozirno) do 5 (potpuno neprozirno). Zrna koja su 25% neprozirna su ocenjena kao tip 2, 50% neprozirna kao tip 3 i 75% neprozirna kao tip 4. Pojedinačni genotipovi su ocenjivani na osnovu najveće zastupljenosti određenog tipa modifikacije pojedinačnih zrna.

Biohemijska analiza F5 i BC1F3 potomstva je rađena samo za one genotipove koji su imali dobru modifikaciju zrna (1 do 3). Ukupan sadržaj proteina urađen je po standardnoj Kjeldahl metodi, *McKenzie*, 1994.

Sadržaj triptofana je određen po metodi datoj u *Nurit i sar.*, 2009. Protokol se bazira na Hopkins-Cole reakciji, u kojoj jedan molekul glioksilne kiseline i dva molekula triptofana formiraju obojeno jedinjenje sa maksimumom apsorpcije na 560nm. Ukratko, slučajni uzorak od 30 zrna je samleven, odmašćen i digestovan papainom. Kolorimetrijska reakcija je razvijena pomoću $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ rastvorenog u glacijalnoj sirćetnoj kiselini i 30N H_2SO_4 . Apsorpcija je očitana na 560nm, pomoću spektrofotometra. Procenat triptofana je izračunat pomoću standardne (kalibracione krive), dobijene na osnovu apsorpcija poznatih količina triptofana, opsega od 0 do 30 $\mu\text{g/ml}$.

Indeks kvaliteta (QI) je određene kao odnos triptofana prema proteinu (% triptofana / % proteina).

Rezultati i diskusija

Program stvaranja genotipova visokog kvaliteta proteina započet je sa 107 hibridnih kombinacija (odabranih na osnovu fenotipskog izgleda biljaka, stepena modifikacije, izgleda i krupnoće F1 zrna), nastalih ukrštanjem između QPM linija iz CIMMYTa (linije belog zrna CML144 i CML159, linije žutog zrna CML161 i CML165, kao i dve sorte - *Sussuma flint* i *Matuba Pro*, belog zrna, visokog kvaliteta

proteina i tvrdog endosperma), ZP *opaque2* linija i ZP linija standardnog kvaliteta zrna.

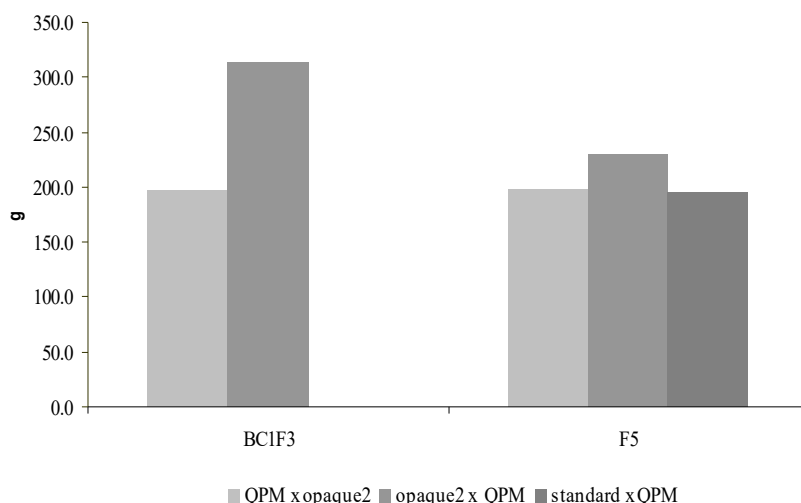
Nakon tri godine selekcije (dve generacije godišnje) formirane su F5 i BC1F3 generacije nekih od početnih ukrštanja. Deo potomstva je tokom selekcije davao jalove klipove, netransformisano seme i/ili je ispoljio osetljivost na *F. graminearum*, **Ignjatović-Mićić i sar.**, 2010. Kod ukrštanja QPM x *opaque2* 76% početnih hibridnih kombinacija je dalo F5 i/ili BC1F3 potomstvo, dok kod ukrštanja *opaque2* x QPM ovi procenti iznose 61% i 39%.

Najmanji broj hibridnih kombinacija koji je tokom selekcije formirao F5 ili BC1F3 generacije je detektovan kod ukrštanja standardne linije x QPM. Samo je devet od početnih 39 kombinacija dalo F5 generaciju, a nijedna BC1F3 generaciju. Te kombinacije su: B73 x CML144, B73 x CML159, B73 x Mat-pro, 255/75-3 x CML144, 255/75-3 x CML161, 255/75-3 x CML165, 255/75-3 x SussF, 255/75-5 x CML144 i 255/75-3 x CML165.

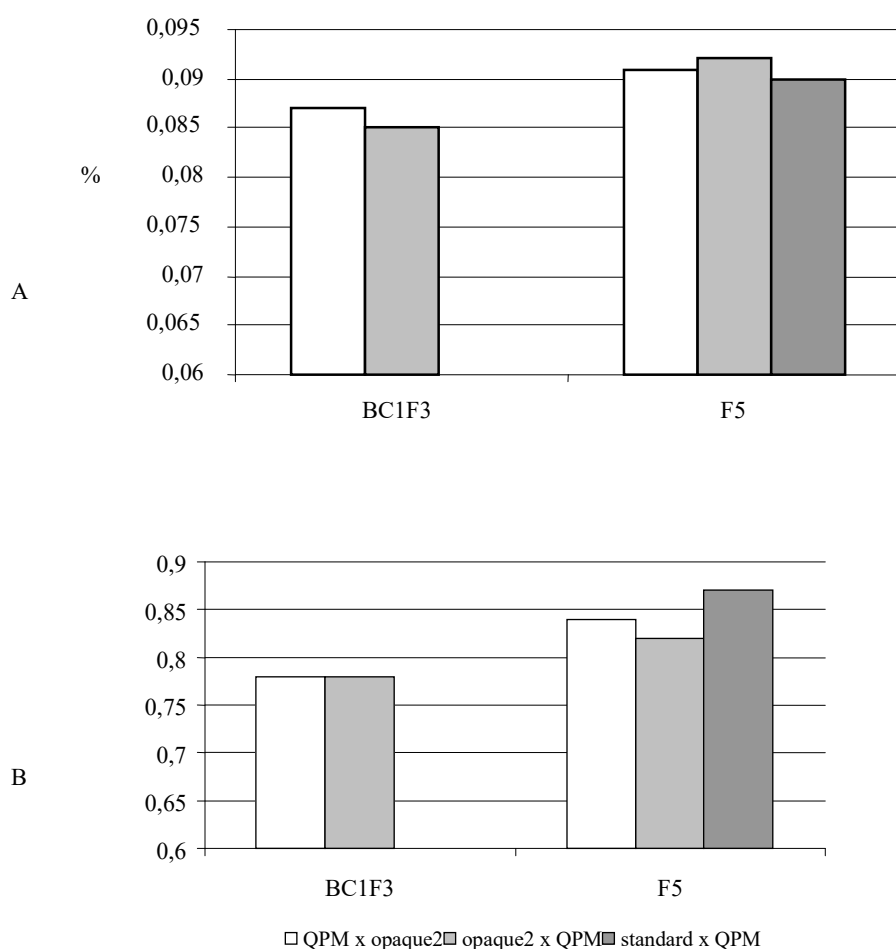
Najverovatnije, neuspele kombinacije su posledica uticaja egzotične germplazme, odnosno neadaptiranosti na naše agro-ekološke uslove.

Prosečne vrednosti ispitivanih fenotipskih svojstava i prinosa po biljci su date u Tabeli 1. Većina ispitivanih svojstava se nije značajno razlikovala između različitih tipova ukrštanja. Prosečan prinos po biljci je bio najviši u BC1F3 generaciji ukrštanja *opaque2* x QPM, a najniži u F5 generaciji ukrštanja standardne linije x QPM (Grafikon 1). Potomstva ukrštanja *opaque2* x QPM su imale najviši prinos po biljci.

Sadržaji lizina i triptofana u zrnu kukuruza su visoko korelisani, **Nurit i sar.**, 2009. Odnos 3:1 lizina prema triptofanu je uočen i kod standardnog i kod QPM kukuruza, **Bjarnson i Vasal.**, 1992, **Vivek i sar.**, 2008. Zbog brže i jednostavnije



Grafikon 1. Prosečan prinos po biljci u BC1F3 i F5 generacijama ukrštanja QPM x *opaque2*, *opaque2* x QPM i standardne linije x QPM
Average yield per plant in BC1F3 and F5 generations of the following crosses: QPM x *opaque2*, *opaque2* x QPM and standard lines x QPM



Grafikon 2. Prosečne vrednosti sadržaja triptofana (A) i indeksa kvaliteta (B) za sva tri tipa ukrštanja
Average values of the tryptophan content (A) and the quality index (B) for all tree types of crosses

metode određivanja sadržaja triptofana, tokom stvaranja QPM germplazme prati se samo sadržaj triptofana. Sadržaj triptofana u celom zrnju F5 i BC1F3 generacija ukrštanja između QPM i *opaque2* linija je bio na nivou sadržaja triptofana (veći od 0,075) QPM germplazme u 72% genotipova. Indeks kvaliteta ovih genotipova je bio nešto niži (0,78%) od granične vrednosti za QPM (0,80%) u BC1F3 generaciji, a viši od 0,80% u F5 generaciji. Sadržaj triptofana i indeks kvaliteta u celom zrnju u sedam od devet ukrštanja između standardnih i QPM linija je bio na nivou QPM germplazme. Prosečne vrednosti sadržaja triptofana i indeksa kvaliteta za sva tri tipa

ukrštanja su prikazani na Grafikonu 2. Ova merenja su izvršena na odabranim klipovima, kod kojih je stepen modifikacije endosperma bio visok (tip zrna od 1 do 3).

Osnovni cilj opisanih istraživanja je stvaranje linija i hibrida visokog kvaliteta proteina, čijim bi se gajenjem obezbedila proizvodnja potrebnih količina biljnih proteina visokog kvaliteta, veće hranjive i biološke vrednosti u ishrani ljudi i domaćih životinja. U QPM kukuruza, zbog povećanog sadržaja triptofana, povećan je sadržaj niacina (vitamin B3), a zbog redukovano sadržaja leucina poboljšano je iskorišćavanje kalcijuma i karotena. Pored toga, QPM kukuruz se može transformisati u jestive proizvode, bez gubitka kvaliteta, pa se može koristiti za proizvodnju konvencionalnih i novih hranjivih proizvoda, *Akuamoa-Boateng* 2002, *Morales-Guerra*, 2002. Pri ovome trebalo bi imati u vidu da QPM kukuruz, zbog visokog kvaliteta proteina (80-90% vrednosti proteina mleka) i visoke biološke vrednosti, može zameniti proteine animalnog porekla u ishrani ljudi i monogastričnih životinja (svinja, živine i ribe). Značaj QPM kukuruza je očigledan i iz činjenice da se 1977. godine kukuruz visokog kvaliteta proteina gajio samo na teritoriji četiri države, a u 2003. godini u 23 države na površini od 3,5 miliona hektara, *Sofi i sar.*, 2009.

Zaključak

Ukrštanjem introdukovane germplazme (izvor QPM) sa domaćom germplazmom, pored QPM linija i hibrida, stvoriće se i domaći pul visokog kvaliteta proteina adaptiranog na lokalne klimatske uslove, koji se dalje može koristiti u selekciji. Uvođenjem u proizvodnju QPM kukuruza znatno bi se smanjio uvoz proizvoda koji se koriste u ishrani životinja (sojina sačma). Značaj gajenja QPM kukuruza (sa visokom hranjivom i biološkom vrednošću) za ishranu domaćih životinja postaje sve veći kada se ima u vidu uticaj globalnog zagrevanja (povećanje temperature vazduha i smanjenje količina padavina) na smanjenje prinosa kukuruza, kao i sve značajnije korišćenje kukuruza u proizvodnji biogoriva.

Napomena

Ovaj rad je realizovan kroz projekat TR 31068 "Poboljšanje svojstava kukuruza i soje molekularnim i konvencionalnim oplemenjivanjem" Ministarstva za prosvetu i nauku RS.

Literatura

Akuamoa-Boateng, A. (2002): Quality protein maize infant feeding trials in Ghana. Ghana Health Service. Ashanti, Ghana.

- Bjarnson, M.** and **S.K. Vasal** (1992): Breeding for quality protein maize. *Plant Breed. Rev.* 9: 181-216.
- Bressani, R.** (1992): Nutritional value of high-lysine maize in humans. In E.T. Mertz (ed.). *Quality Protein Maize*. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, USA.
- Crow, J.F.** and **J. Kermicle** (2002): Oliver Nelson and quality protein maize. *Genetics* 160 (3): 819-821.
- Eggum, B.O., J. Dumanović, D. Mišević** and **M. Denić** (1983): Grain yield and nutritive value of high oil opaque and waxy maize hybrids. *J. Cereal Sci.* 1: 139-145.
- Eggum, B.O., J. Dumanović, D. Mišević** and **M. Denić** (1985): Nutritive quality and energy yield of high oil, opaque-2 and waxy maize hybrids compared to normal maize hybrids. *Qual. Plant Foods Num. Nutr.* 35 (2): 165-174.
- FAO** (1992): *Maize in Human Nutrition*, ed. FAO, Rome, Italy.
- Ignjatović-Micić, D., S. Stanković, G. Stanković** and **M. Denić** (2010): Comparative resistance of quality protein maize F2 and BC1 populations to *F. graminearum*. Book of Proceedings of the 45th Croatian and the 5th International Symposium on Agriculture, February 15-19, 2010, Opatija, Croatia, pp 427-431.
- Krivaneck, A., H. Groote, N. Gunaratna, A. Diallo** and **D. Freisen** (2007): Breeding and disseminating quality protein maize for Africa. *Afr. J. Biotech.* 6: 312-324.
- McKenzie, H.A.** (1994): The Kjeldahl determination of nitrogen: retrospect and prospect. *Trends Anal. Chem.* 13 (4): 138-144.
- Mertz, E.T., L.S. Bates** and **O.E. Nelson** (1964): Mutant that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science* 145: 279-280.
- Morales -Guerra, M.** (2002): Efecto del consumo de maiz de alta calidad proteinica en nino(a)s de familias indigenas de las regiones Mazateca y Mixe del Estado de Oaxaca. PhD Thesis, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo. de Mexico.
- Nurit, E., A. Tiessen, K. Pixley** and **N. Palacios-Rojas** (2009): A reliable and inexpensive colorimetric method for determining protein-bound tryptophan in maize kernels. *J. Agric. Food Chem.* 57:7233-7238.
- Sofi, P.A., S.A. Wani, A.G. Rather** and **S.H. Wani** (2009): Review article: Quality protein maize (QPM): Genetic manipulation for the nutritional fortification of maize. *J. Plant Breed. Crop Sci.* 1 (6): 244-253.
- Vivek B.S., A.F. Krivaneck, N. Palacios-Rojas, S. Twumasi-Afriyie** and **A.O. Diallo** (2008): Breeding Quality Protein Maize (QPM): Protocols for Developing QPM Cultivars. Mexico, D.F.: CIMMYT.

Primljeno: 27.09.2011.

Odobreno: 03.10.2011.

* *
*

Phenotypic and Biochemical Characteristics of Maize Genotypes during Selection for High Quality Protein in Grain

- Original scientific paper -

Dragana IGNJATOVIĆ-MIĆIĆ, Marija KOSTADINOVIĆ, Ksenija MARKOVIĆ,
Slađana ŽILIĆ, Snažana MLADENOVIĆ DRINIĆ and Goran STANKOVIĆ
Maize Research Institute Zemun Polje, Belgrade-Zemun

Summary

Maize nutritional value is very poor due to deficiency of two essential amino acids - tryptophan and lysine. It was shown that *opaque2* (*o2*) mutations increased lysine by 69-100% and tryptophan by 66% in the endosperm. The incorporation of *opaque2* into high yielding commercial cultivars failed, because of its numerous agronomic and processing problems, caused by endosperm softness. These drawbacks have been corrected in genetically improved, hard endosperm quality protein maize (QPM) - a genotype in which *opaque2* has been incorporated along with associated modifiers. The breeding project at the Maize Research Institute, Zemun Polje, involves QPM x *opaque2*, *opaque2* x QPM and standard lines x QPM crosses, with the aim to improve MRI *opaque2* or convert standard lines into QPM germplasm. F₅ and BC₁F₃ plants of these crosses were phenotyped, yield per plant was determined and endosperm modification assessment and kernel biochemical analysis (protein content, tryptophan content and quality index) were performed, with the aim to select plants for further selection process. *Opaque2* x QPM progenies had the highest yield per plant - 314.3 g in BC₁F₃ and 230.2 g in F₅. The tryptophan content and the quality index in the whole grain of QPM and *opaque2* progenies were at the levels set for QPM germplasm in 72% analysed genotypes, as well as, in seven out of nine genotypes of standard lines x QPM crosses. All genotypes that had poorly modified kernels, the low tryptophan content and/or the low yield per plant will be discarded from further breeding.

Received: 27/09/2011

Accepted: 03/10/2011

Adresa autora:

Dragana IGNJATOVIĆ-MIĆIĆ
Institut za kukuruz "Zemun Polje"
Slobodana Bajića 1
11185 Beograd-Zemun
Srbija
E-mail: idragana@mrizp.rs